

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-181778

(43) 公開日 平成6年(1994)7月5日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/57	Z N A			
C 0 7 K 13/00		8517-4H		
C 1 2 N 1/21		7236-4B		
9/16	B	9359-4B		
		9050-4B		
		C 1 2 N 15/00		A

審査請求 未請求 請求項の数11(全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平4-335935

(22) 出願日 平成4年(1992)12月16日

(71) 出願人 000002934

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

(72) 発明者 菅田 治夫

茨城県土浦市下高津4丁目5番26号

(72) 発明者 細谷 昌樹

茨城県つくば市東2丁目13番地の19

(72) 発明者 大野 忠夫

茨城県牛久市柏田町駅東土地区画整理45街区5番地の6

(74) 代理人 弁理士 岩田 弘 (外4名)

(54) 【発明の名称】 ヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質をコードするDNAおよびその用途

(57) 【要約】

【目的】 ヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質をコードするDNAを含有するDNAの単離および該DNAを用いるタンパク質の生産。

【構成】 ヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質をコードするDNAを含有するDNAをヒトcDNAライブラリーから単離し、その塩基配列を決定した。

【効果】 ヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質をコードするDNAを含有するDNAおよび該DNAを発現させて得られる該蛋白質は、(1) 神経生理・生化学、免疫学の研究や該蛋白質の抗体提供に有用であり、該抗体は神経系腫瘍等の診断薬として用いることができ、また(2) 活性調節・機能阻害等の神経系・免疫系に作用する医薬の開発に有用であり、特に該蛋白質の欠損、機能不全に起因する疾病、例えば免疫不全に対する遺伝子治療剤として有効に用いることができる。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質をコードするDNAを含有するDNA。

【請求項2】 配列番号1の塩基配列を有するものである請求項1記載のDNA。

【請求項3】 配列番号2の512個のアミノ酸から成るヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質をコードする請求項1記載のDNA。

【請求項4】 ヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質をコードするcDNA。

【請求項5】 配列番号1の塩基配列を有するものである請求項4記載のcDNA。

【請求項6】 ヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質。

【請求項7】 配列番号2で示される512個のアミノ酸残基を含有するアミノ酸配列を有する請求項6記載のヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質。

【請求項8】 ヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質をコードするDNAを含有するDNAを保持する形質転換体。

【請求項9】 ヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質をコードするcDNAを保持する形質転換体。

【請求項10】 宿主がエシェリヒア属菌である請求項8または請求項9記載の形質転換体。

【請求項11】 請求項8または9記載の形質転換体を培養し、培養物中に成熟ヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする成熟ヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質をコードするDNAを含有するDNA、ヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質および該蛋白質の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 カルシニューリン (Klee, C. B. et al. プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユー・エス・エイ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 79: 6270-6273; 1979) は蛋白質の脱リン酸化反応を触媒するプロテインホスファターゼの1種である (Stewart, A. A. et al. フェブス・レターズ (FEBS Lett.) 137: 80-84; 1982)。カルシニューリンなどのプロテインホスファターゼが関与する蛋白質のリン酸化・脱リン酸化反応は、細胞外から各種受容体蛋白質が受け取った特定の刺激を増幅・伝達する経路として細胞の機能調節においてきわめて重要である。蛋白質はプロテインキナーゼによってリン酸化され、プロテインホスファターゼによって脱リン酸化される。プロテインホスファター

2

ゼはセリンまたはスレオニン残基に付加されたリン酸基をはずすもの (セリン/スレオニンホスファターゼ) とリン酸化チロシンに作用するもの (チロシンホスファターゼ) の2つに大別され、カルシニューリンはその前者に属する。

【0003】 カルシニューリンはおよその分子量が61 kDのAサブユニットと19 kDのBサブユニットからなるヘテロダイマーの蛋白質である (Klee, C. B. et al. アドバンシズ・イン・エンザイモロジー (Adv. Enzymol.) 61: 149-200; 1987)。Aサブユニット (カルシニューリンA) はプロテインホスファターゼとしての触媒活性部位を含み、さらにカルシウム結合蛋白質として細胞の機能調節に重要であるカルモジュリンとの結合部位をもつ。AサブユニットにはA α 、A β のタイプ、さらにA β にはA1、A2のサブタイプの合計3種のアイソフォームが存在することが知られている。Bサブユニット (カルシニューリンB) はEFハンド型カルシウム結合部位を有し、その分子種は精巢特異的なものを除くと1種類のみである。カルシニューリンは中枢神経系に多量に存在しており、また、その他の末梢組織にも存在する。特に、ラットにおける知見から、カルシニューリンAアイソフォームの分布には差があり、それぞれのアイソフォームにおける異なった生理的役割の存在が示唆されている。脳内のあらゆる領域において、A α はA β よりも2~4倍多く存在している (Kuno, T. et al. ジャーナル・オブ・ニューロケミストリー (J. Neurochem.) 58: in press; 久野高義ほか、実験医学10: 1238-1242; 1992)。カルシニューリンが神経系に多量に存在することから、この蛋白質が神経系の機能調節に重要な役割を果たしていることが考えられ、その生理的役割や神経特異的な発現機構の解明、カルシニューリン特異的阻害薬の開発等が進められている。

【0004】 また近年、臓器移植の際の拒絶反応を抑えたり、自己免疫疾患の治療などに用いられている強力な免疫抑制剤であるサイクロスポリンAやFK506の作用機序の研究から、カルシニューリンがこれらの免疫抑制剤の共通の標的であることが明らかにされた (Liu, J. et al. セル (Cell) 66: 807-815 (1991))。各々の免疫抑制剤はイムノフィリンと呼ばれる免疫抑制剤結合蛋白質と結合し、その複合体がカルシニューリンと結合することによってカルシニューリンのホスファターゼ活性を阻害する。その結果として、リン酸化によって機能調節されている蛋白質の脱リン酸化が阻害され、その中でも特に、NF-ATと呼ばれる転写因子等の脱リン酸化阻害によって、この因子に依存したリンホカイン遺伝子の転写が抑制される (Mattilla, P. S. et al. エンボ・ジャーナル (EMBO J.) 9: 4125-4133; 1990; Emmel, E. A. サイエンス (Science) 246: 1617-1620; 1990)。

9)。カルシニューリンに関するこのような知見は従来より多くの努力が積み重ねられて来た免疫抑制剤の作用機序の解明に対し、その端緒を拓くものである。

【0005】カルシニューリンの構造の解明については遺伝子組み換え技術の適用により、特にホスファターゼ活性を担うAサブユニットについて、ヒト、ウシ、ラット、マウス等の構造決定がなされてきた。特にラットについてはA α 、A β (A1、A2)の3種のタイプについて全て構造決定がなされた (Ito, A. et al. バイオケミカル・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.) 163: 1492-1497; 1989; Kuno, T. et al. バイオケミカル・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.) 165: 1352-1358; 1989)。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】ヒトではカルシニューリンA β についてはA1、A2ともにその構造が完全に明らかにされているが (Guerini, D. and Klee, C. B, プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユー・エス・エイ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 86: 9183-9187; 1989)、A α アイソフォームについては部分的に構造が決定されているのみである (Kincaid, R.L. et al. ザ・ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) 265: 11312-11319; 1990)。

【0007】カルシニューリンAの活性調節をその主要な作用機作とする医薬品の研究、開発を進めることを考えた場合、それぞれのアイソフォームにおいて異なる生理作用が予想されることから、ヒトの全てのカルシニューリンAアイソフォームの構造、性質を明らかにする必要がある。また、特に神経系において主に存在するA α アイソフォームの完全な構造の決定は、神経系に作用する医薬の開発にとって重要な課題であった。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らはヒトからも完全なカルシニューリンA α アイソフォームを採取し、しかもそれを遺伝子組み換え技術によって製造することができれば、今後の研究、医薬品開発に多大な効果を奏することができると考え、研究を重ねた結果、ヒト神経芽細胞腫のcDNAライブラリーより、はじめて完全長の翻訳領域をもつカルシニューリンA α アイソフォームをコードするcDNAのクローニングおよびその翻訳領域の完全塩基配列を解明することに成功した。さらに、このcDNAからヒトカルシニューリンA α アイソフォームのアミノ酸配列を明らかにし、これを遺伝子組み換え技術によって大量に生産する道を拓くことに成功したものである。

【0009】本発明は(1)ヒトカルシニューリンA α

アイソフォーム蛋白質をコードするDNAを含有するDNA、(2)ヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質、(3)ヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質をコードするDNAを含有するDNAを保持する形質転換体、および(4)該形質転換体の培養、培養物中への蛋白質の生産蓄積、採取を包含するヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質の製造方法に関するものである。

【0010】本発明者はヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質をコードするDNAを含有するDNAとして図1に示す1種類のものをクローニングし、その翻訳領域の完全な蛋白質の一次構造を推定した(図2および図3)。この配列における第1番目のメチオニンが開始コドンと考えられる。N末端の配列解析により、このカルシニューリンA α アイソフォームにはA β アイソフォームに存在するようなプロリン残基のクラスターが全く存在しない。A β アイソフォームにおいてはこのプロリン残基のクラスターがカルモジュリンとの相互作用において重要であることが推定されており、A α アイソフォームがこのような構造を持たないことはA α 、A β の2種のアイソフォームの間に何らかの機能的差異が存在することを示唆するものである。15番目のアスパラギン酸より446番目のセリンまでの部分は、特に一致するアミノ酸残基を併せて示したようにカルシニューリンAのアイソフォームA α 、A β (A1、A2)の間できわめて構造が類似している(図4および図5)。この部分は酵素活性を担う部分およびカルモジュリン結合部位を包含しており (Hubbard, M. J. and Klee, C. B. バイオケミストリー (Biochemistry) 28: 1968-1974; 1989)、カルシニューリンA蛋白質を特徴づける重要な部分である。A β アイソフォームのサブタイプA1、A2は図4および図5に示す一部の挿入部およびC末端のアミノ酸配列が異なるのみで、cDNAの解析から共通の遺伝子から転写後のスプライシングによってA1、A2の差異が生じることが示されている。A α アイソフォームはこれらと遺伝子を異にすることがラットにおいてすでに示されているが (Kuno, T. et al. バイオケミカル・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.) 165: 1352-1358; 1989)、今回その構造を明らかにしたヒトのA α アイソフォームも、ラットと同様にA β アイソフォームとは異なる遺伝子に由来することによってA β との差異が生じるものと考えられる。

【0011】ラットにおいて示されているようなA α アイソフォームは脳内においてカルシニューリンAの大半を占めることから、ヒトのA α の完全な構造を解明することは、ヒトにおける本蛋白質の機能解明に多大な貢献をするものと考えられる。特に、カルシニューリンの機能調節を主な作用機作とする神経系の医薬の開発を進め

るためには、ヒトカルシニューリンA α を単離し、その特徴を知ることが必要である。

【0012】本発明のヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質をコードするDNAを含有するDNAとしては、ヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。すなわち、本発明のヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質をコードするDNAを含有するDNAは、cDNA、ゲノムDNAの何れであってともよく、該DNAのスクリーニングは一般の遺伝子工学的的手法あるいはそれに準じる方法を用いて行うことができる。

【0013】ヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質の発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。この時、先に述べたように効率的に分泌生産させるために、ヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質をコードするDNAの上流側に適当なシグナル配列をコードするDNAを付加する。

【0014】クローン化されたヒトカルシニューリンA α アイソフォームをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。さらに該DNAを発現させるにはその上流にプロモーターを接続する。

【0015】ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、あるいは入ファージなどのバクテリオファージおよびレトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。形質転換する際の宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ PLプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなど

が好ましい。

【0016】宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーターなどがそれぞれ利用できる。なお、発現にエンハンサーの利用も効果的である。また、必要に応じて分泌発現を行なわせるためには、宿主に合ったシグナル配列を、カルシニューリンA α アイソフォームのN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、アルカリフォスファターゼ・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、メイティングファクター α ・シグナル配列、インペルターゼ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、例えばインシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

【0017】このようにして構築されたヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造する。宿主としては、たとえばエシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫、動物細胞などが用いられる。上記エシェリヒア属菌、バチルス属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 (ブローニング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60, 160 (1968)), JM103 (ヌクレック・アシックス・リサーチ, (Nucleic Acid Research), 9, 309 (1981)), JA221 (ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120, 517 (1978)), HB101 (ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー 41, 459 (1969)), C600 (ジェネティックス (Genetics), 39, 440 (1954)) などが用いられる。上記バチルス属菌としては、たとえばバチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 (ジーン, 24, 255 (1983)), 207-21 (ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry) 95, 87 (1984)) などが用いられる。上記酵母としては、たとえばサッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R-, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12などが用いられる。昆虫としては、例えばカイコの幼虫などが用いられる(前田ら、ネイチャー (Nature), 315, 592 (1985))。動物細胞としては、たとえばサル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO, マウスL細胞, ヒトFL細胞などが用いられる。

【0018】上記エシェリヒア属菌を形質転換するに

は、たとえばプロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69, 2110 (1972) やジーン, 17, 107 (1982) などに記載の方法に従って行なわれる。パチルス属菌を形質転換するには、たとえばモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168, 111 (1979) などに記載の方法に従って行われる。酵母を形質転換するには、たとえばプロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75, 1929 (1978) に記載の方法に従って行なわれる。動物細胞を形質転換するには、たとえばヴィロロジー (Virology) 52, 456 (1973) に記載の方法に従って行なわれる。

【0019】このようにして、ヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体が得られる。

【0020】宿主がエシェリヒア属菌、パチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コンストップ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としてはたとえば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。

【0021】培地のpHは約5~8が望ましい。エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地 (ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972) が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、たとえば β -インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることができる。

【0022】宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がパチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえばバークホルダー (Burkholder) 最小培地 (Bostian, K. L. ら, 「プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 77, 4505 (1980)」) や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 (Bitter, G. A.

ら, 「プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 81, 5330 (1984)」) が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0023】宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえば約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地 (サイエンス (Science) 122, 501 (1952)), DMEM培地 (ヴィロロジー (Virology), 8, 396 (1959)), RPMI 1640培地 (ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199, 519 (1967)), 199培地 (プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine) 73, 1 (1950)) などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0024】上記培養物からヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質を分離精製するには、例えば下記の方法により行なうことができる。ヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質を培養菌体あるいは細胞から抽出する際には、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質の粗抽出液を得る方法などが適宜用い得る。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのたんぱく変性剤や、トリトンX-100などの界面活性剤が含まれていてもよい。

【0025】培養液中にヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的新和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

【0026】なお、組換え体が産生するヒトカルシニ

ーリンA α アイソフォーム蛋白質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼなどが用いられる。かくして生成するヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質の活性は特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。また生成物に脱リン酸化活性がある場合は、該活性を指標にして測定することもできる。

【0027】以上、ヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質の発現ベクターの作製と、それらによる形質転換体の製造、該形質転換体を用いたヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質の製造及びその有用性等について詳細に述べた。本発明明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL-体を示すものとする。

【0028】DNA : デオキシリボ核酸

cDNA : 相補的デオキシリボ核酸

A : アデニン

T : チミン

G : グアニン

C : シトシン

RNA : リボ核酸

mRNA : メッセンジャーリボ核酸

dATP : デオキシアデノシン三リン酸

dTTP : デオキシチミジン三リン酸

dGTP : デオキシグアノシン三リン酸

dCTP : デオキシシチジン三リン酸

ATP : アデノシン三リン酸

EDTA : エチレンジアミン四酢酸

SDS : ドデシル硫酸ナトリウム

EIA : エンザイムイムノアッセイ

Gly または G : グリシン

Ala または A : アラニン

Val または V : バリン

Leu または L : ロイシン

Ile または I : イソロイシン

Ser または S : セリン

Thr または T : スレオニン

Cys または C : システイン

Met または M : メチオニン

Glu または E : グルタミン酸

Asp または D : アスパラギン酸

Lys または K : リジン

Arg または R : アルギニン

His または H : ヒスチジン

Phe または F : フェニールアラニン

Tyr または Y : チロシン

Trp または W : トリプトファン

Pro または P : プロリン

Asn または N : アスパラギン

Gln または Q : グルタミン

なお、本発明のヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質においては、そのアミノ酸配列の一部が修飾(付加、除去、その他のアミノ酸への置換など)されていてもよい。

【0029】

【実施例】以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。後述の実施例4で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) MV1184/pCNA106は、平成4年12月10日通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所(FRI)に受託番号FERM BP-4111として寄託されている。

20 【0030】【実施例1】 ヒト神経芽細胞腫LA-N-2由来cDNAライブラリーの作成

ヒト神経芽細胞腫LA-N-2より市販のmRNA抽出キット(インビトロゲン社)を用いてmRNAを抽出・精製した。cDNA合成キット(アマシャム社)を用いて精製mRNA約10 μ gよりcDNAを合成した。このcDNAの末端をT4DNAポリメラーゼ(アマシャム社)で平滑にした後EcoRIアダプター(アマシャム社)を付加した。このcDNAを λ gt11ベクター(アマシャム社)に結合し、インビトロパッケージングキット(アマシャム社)を使用してパッケージングを行なった。このライブラリーは1.6 \times 10⁸個の独立した組み換え体ファージを含有するものであった。

【0031】【実施例2】 プローブの精製

以前にヒト精巢のcDNAライブラリー(クロンテック社)よりヒトPACAP前駆体のクローニングを行ない、クローンpHT38p8を単離してあったので(特願平2-39841号)、これをEcoRI、PstI(タカラ社)で切断した後、このクローンの挿入断片の5'側に相当する約300塩基対のDNAを調製した。これを(α -³²P)-dCTP(アマシャム社)とランダムプライマー法による標識キット(アマシャム社)を用いて標識し、プローブとして用いた。

【0032】【実施例3】 スクリーニング

1.6 \times 10⁸ p.f.u.(ブランク フォーミング ユニット)分の λ gt11ベクターcDNAライブラリーを硫酸マグネシウムで処理したY1090と混ぜ、37℃、15分間インキュベートした後、0.5%アガロース(ファルマシア社)LBを加え、1.5%寒天(和光純薬社)LBプレートに播いた。ブランクのできたプレートにニトロセルロースフィルターを置き、フィルター上

にブランクを転写した。このフィルターをアルカリ処理することによって変性させた後、80℃3時間の加熱によってDNAの固定を行なった。このフィルターを50%ホルムアミド(ベセスダ リサーチ ラボラトリー社(Bethesda Research Laboratories))、5×デンハルト液(0.02%ウシ血清アルブミン(シグマ社)、0.02%ポリビニルピロリドン(シグマ社)、0.02%フィコール(シグマ社)、5×SSPE(0.15モル塩化ナトリウム、0.01モルリン酸1ナトリウム、1ミリモルEDTA)、0.1%SDS、加熱変成した100μg/mlサケ精子DNA(シグマ社)からなるバッファー中で先に標識したプローブと一緒に一晩インキュベートし、ハイブリダイズさせた。洗浄は2×SSC、0.1%SDSで55℃1時間おこない、その後、-80℃でオートラジオグラフィをおこなってハイブリダイズするクローンを検出した。

【0033】(実施例4) DNA配列解析
一つのクローンが同定され、配列解析のためにpUC118(タカラ社)にサブクローニングした。このプラスミドで大腸菌MV1184を形質転換し、形質転換体エシエリヒア・コリ(Escherichia coli) MV1184/pCNA106を得た。このプラスミドをさらにエキソヌクレアーゼ消化によって段階的に削って行き、または適当な制限酵素によって切断後自己閉環あるいはサブクローニングし、配列解析のための鋳型DNAを調製した。配列決定には蛍光式DNAシーケンサー(アプライドバイオシステムズ社)を用い、データー解析にはDNASIS(日立ソフトウェアエンジニアリング社)を使用した。

【0034】図2および図3にこのヒトカルシニューリンAαアイソフォーム蛋白質のDNAの塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列をともに示す。

【0035】(実施例5) ノザンプロットングによる転写産物の検出

ヒトカルシニューリンAαアイソフォームcDNAの翻訳領域の5'側に存在する2カ所のEcoRV切断部位を用い、約400bpのDNA断片をプローブとして調製した。これを先に述べた方法と同様にランダムプライム法にて放射標識した。LA-N-2細胞より調製したmRNA分画より5μgを用い、グリオキサールを含むバッファー(1Mグリオキサール(和光純薬社)、50%ジメチルスルフォキシド(シグマ社)、0.01Mリン酸ナトリウムpH7.0)中で50℃で1時間保温した。これを1.2%アガロースゲルを用いて電気泳動し、ニトロセルロースフィルター上に転写した。RNAを転写したフィルターを80℃で2時間処理した後、50%ホルムアミド、5×デンハルト液、10×SSC、50mMリン酸ナトリウム(pH6.5)、加熱変成した100μg/mlサケ精子DNAからなるバッファー中で先に標識したプローブと一緒に一晩インキュベート

し、ハイブリダイズさせた。洗浄は2×SSC、0.1%SDSで55℃で1時間行ない、その後-80℃でオートラジオグラフィを行なってハイブリダイズするバンドを検出した(第6図)。

【0036】

【発明の効果】本発明のDNAでDNA感染または形質転換した菌体や細胞では、大量のヒトカルシニューリンAαアイソフォーム蛋白質を産生せしめることができ、ヒトカルシニューリンAαアイソフォーム蛋白質の生産を有利に導くことができる。本発明のヒトカルシニューリンAαアイソフォーム蛋白質をコードするDNAを含有するDNAおよび該DNAから製造されるヒトカルシニューリンAαアイソフォーム蛋白質は神経生理・生化学、免疫学の研究、該蛋白質の抗体提供、該蛋白質の活性調節・機能阻害を主な作用機として神経系・免疫系に作用する医薬の開発等につながるものである。

【0037】近年、カルシニューリンが属するプロテインフォスファターゼは細胞癌化のプロモーションの過程に関与している可能性が示唆されている(Suganuma, M. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1768, 1988; Baysteds, T.A.J. et al. Nature(London)337, 78, 1989)。また、神経系腫瘍組織におけるカルシニューリンの免疫化学的研究の結果、特定のタイプの腫瘍組織にカルシニューリン陽性細胞が検出される傾向にある(Goto, S. et al. Brain Res. 371, 237-243, 1986)。したがって、本発明のヒトカルシニューリンAαアイソフォーム蛋白質を用いてより特異性の高い抗体の調整ができ、それを特定の神経系腫瘍の診断薬として有効に用いることができる。また、PCR法による遺伝子増幅のプライマーとして本発明のDNA配列の一部を用いることができ、遺伝子診断用の診断薬としても用いることができる。さらには、ヒトカルシニューリンAαアイソフォーム蛋白質の欠損、機能不全に起因する疾病、例えば免疫不全に対する遺伝子治療剤として有効に用いることができる。

【0038】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 1620

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

起源:

生物名: ヒトカルシニューリンAαアイソフォーム

配列の特徴

特徴を表す記号: CDS

存在位置: 55...1587

特徴を決定した方法: E

特徴を表す記号: mature peptide

(8)

特開平6-181778

13

14

存在位置: 55...1587

特徴を決定した方法: S

配列:

GGGGTGTGCA GTCGGACGGA CGAGCAGCGC GT
CGCTGTCC TCCGGCAGCT GGAGATGTCC 60
GAGCCCAAGG CAATTGATCC CAAGTTGTCT AC
GACCGACA GGGTGGTGAA AGCTGTTCCA 120
TTTCCTCCAA GTCACCGGCT TACAGCAAAA GA
AGTGTTTG ATAATGATGG AAAACCTCGT 180
GTGGATATCT TAAAGGCGCA TCTTATGAAG GA
GGGAAGGC TGGAAGAGAG TGTTGCATTG 240
AGAATAATAA CAGAGGGTGC ATCAATTCTT CG
ACAGGAAA AAAATTTGCT GGATATTGAT 300
GCGCCAGTCA CTGTTTGTGG GGACATT'CAT GG
ACAATTCT TTGATTTGAT GAAGCTCTTT 360
GAAGTCGGGG GATCTCCTGC CAACACTCGC TA
CCTCTTCT TAGGGGACTA TGTTGACAGA 420
GGGTACTTCA GTATTGAATG TGTGCTGTAT TT
GTGGGCCT TGAAAATTCT CTACCCCAAA 480
ACACTGTTTT TACTTCGTGG AAATCATGAA TG
TAGACATC TAACAGAGTA TTTACATTT 540
AAACAAGAAT GTAAAATAAA GTATTCAGAA CG
CGTATATG ATGCCTGTAT GGATGCCTTT 600
GACTGCCTTC CCCTGGCTGC CCTGATGAAC CA
ACAGTTCC TGTGTGTGCA TGGTGGTTTG 660
TCTCCAGAGA TTAACACTTT AGATGATATC AG
AAAATTAG ACCGATTCAA AGAACCACCT 720
GCATATGGAC CTATGTGTGA TATCCTGTGG TC
AGACCCCC TGGAAGATTT TGGAAATGAG 780
AAGACTCAGG AACATTTTAC TCACAACACA GT
CAGGGGGT GTTCATACTT CTACAGTTAC 840
CCGGCTGTAT GTGAATTCTT ACAGCACAAT AA
CTTGTTAT CTATACTCCG AGCCCACGAA 900
GCCCAAGATG CAGGGTACCG CATGTACAGG AA
AAGCCAAA CAACAGGCTT CCCTTCTCTA 960
ATTACAATTT TTTCAGCACC AAATTACTTA GA
TGTATACA ATAACAAAGC TGCAGTATTG 1020
AAGTATGAGA ACAATGTTAT GAATATCAGG CA
ATTCAACT GTTCTCCTCA TCCATACTGG 1080
CTTCCAAATT TCATGGATGT TTTTACTTGG TC
CCTTCCAT TTGTTGGGGA AAAAGTGACT 1140
GAGATGCTGG TAAATGTCCT CAACATCTGC TC
AGATGATG AACTAGGGTC AGAAGAAGAT 1200
GGATTTGATG GTGCAACAGC TGCAGCCCGG AA
AGAGGTGA TAAGGAACAA GATCCGAGCA 1260
ATAGGCAAAA TGGCCAGAGT GTTCTCAGTG CT
CAGAGAAG AGAGTGAGAG TGTCTTGACG 1320
CTGAAAGGCT TGACCCCAAC TGGCATGCTC CC
CAGCGGAG TACTTTCTGG AGGGAAGCAA 1380
ACCCTGCAAA GCGCTATCAA AGGATTTTCA CC
ACAACATA AGATCACTAG CTTCGAGGAA 1440

15
GCCAAGGGCT TAGACCGAAT TAATGAGAGG AT
GCCGCCTC GCAGAGATGC CATGCCCTCT 1500
GACGCCAACC TTAACCTCCAT CAACAAGGGT CT
CACCTCAG AGACTAACGG CACGGACAGC 1560
AATGGCAGTA ATAGCAGCAA TATTCAAGTGA CC
ACTTCCTG TTCACCTTTT TTTT TTTT 1620

配列番号: 2

配列の長さ: 512

配列の型: アミノ酸

*トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク

*

配列:

M S E P K A I D P K L S T T D R V V K A 20
V P F P P S H R L T A K E V F D N D G K 40
P R V D I L K A H L M K E G R L E E S V 60
A L R I I T E G A S I L R Q E K N L L D 80
I D A P V T V C G D I H G Q F F D L M K 100
L F E V G G S P A N T R Y L F L G D Y V 120
D R G Y F S I E C V L Y L W A L K I L Y 140
P K T L F L L R G N H E C R H L T E Y F 160
T F K Q E C K I K Y S E R V Y D A C M D 180
A F D C L P L A A L M N Q Q F L C V H G 200
G L S P E I N T L D D I R K L D R F K E 220
P P A Y G P M C D I L W S D P L E D F G 240
N E K T Q E H F T H N T V R G C S Y F Y 260
S Y P A V C E F L Q H N N L L S I L R A 280
H E A Q D A G Y R M Y R K S Q T T G F P 300
S L I T I P S A P N Y L D V Y N N K A A 320
V L K Y E N N V M N I R Q F N C S P H P 340
Y W L P N P M D V F T W S L P F V G E K 360
V T E M L V N V L N I C S D D E L G S E 380
E D G F D G A T A A A R K E V I R N K I 400
R A I G K M A R V F S V L R E E S E S V 420
L T L K G L T P T G M L P S G V L S G G 440
K Q T L Q S A I K G F S P Q H K I T S F 460
E E A K G L D R I N E R M P P R R D A M 480
P S D A N L N S I N K G L T S E T N G T 500
D S N G S N S S N I Q * 512

【図面の簡単な説明】

【図1】ヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質をコードするcDNAクローンの制限酵素切断地図および翻訳領域の位置を示した図である。枠で囲んだ部分が翻訳領域である。SaはSacIを示す。AはAccIを示す。EはEcoRIを示す。KはKpnIを示す。PはPstIを示す。SpはSphIを示す。XはXbaIを示す。

【図2】ヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質のDNAの塩基配列を、それから推定されるアミノ酸配列とともに示した図である。

【図3】ヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質のDNAの塩基配列を、それから推定されるアミノ酸配列とともに示した図である。

【図4】ヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質

質と他のヒトカルシニューリンA β アイソフォーム蛋白質のアミノ酸配列とを比較して示した図である。本発明の蛋白質(カルシニューリンA α)はCNAAで表示し、他のヒトのアイソフォーム(カルシニューリンA β 1, A β 2)はCNBA1, CNBA2で表示する。アミノ酸の番号はCNAAの最初のメチオニンを基準とし、最大の類似度を示すように併置してある。またCNBA1の一部は挿入部として示してある。

【図5】ヒトカルシニューリンA α アイソフォーム蛋白質と他のヒトカルシニューリンA β アイソフォーム蛋白質のアミノ酸配列とを比較して示した図である。本発明の蛋白質(カルシニューリンA α)はCNAAで表示し、他のヒトのアイソフォーム(カルシニューリンA β 1, A β 2)はCNBA1, CNBA2で表示する。ア



(10)

特開平6-181778

17

18

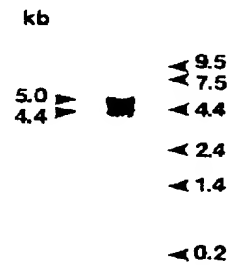
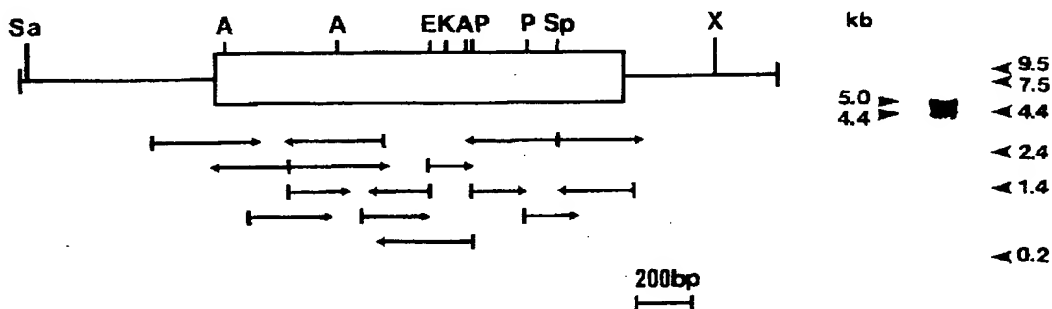
ミノ酸の番号はCNAAの最初のメチオニンを基準とし、最大の類似度を示すように併置してある。またCNBA1の一部は挿入部として示してある。

ンA α アイソフォームのmRNAの大きさを示した図である。図の右には一緒に泳動した分子量マーカーの位置を示し、左には検出されたRNAの大きさを示した。

【図6】LA-N-2細胞におけるヒトカルシニューリ

【図1】

【図6】



【図5】

	370	380	390	400	410	420
CNAA	VTENLYNYLNICSDDELGSEEDGFDGATAAARKEVIRNKIRAIGKMARVFSYLREESESV					
CNBA1	VTENLYNYLSICSDDELMTEGEDQFDGSAAARKEIIRNKIRAIGKMARVFSYLREESESV					
CNBA2	VTENLYNYLSICSDDELMTEGEDQFDGSAAARKEIIRNKIRAIGKMARVFSYLREESESV					
	430	440		450	460	470
CNAA	LTLKGLTPTGNLPSGYLSGGRQTLQSAIVEAIEADEAIXGFSPQHKITSFEEAKGLDRIN					
CNBA1	LTLKGLTPTGNLPSGYLAGGRQTLQSGNDVMQLAVPQMDWGTPHSFANNSHNACREFLLF					
CNBA2	LTLKGLTPTGNLPSGYLAGGRQTLQSATVEAIEAEKAIKGFSPPHRICSFEEAKGLDRIN					
	480	490	500	510		
CNAA	ERMPPRRDAMPDANLNSINKGLTSETNGTDSNGSNSSNIQ					
CNBA1	FSSCLSS					
CNBA2	ERMPPRKDAVQQDG FNSLNTAHATENHGTGNHTAQ					



【図2】

```

1  GGGGTGTGCAGTCGGACGGACGAGCAGCGCGTCTGTCTCCGGCAGCTCCAGATGTCC 60
1
1  M S 2
61  GAGCCCAAGGCAATTGATCCCAAGTTGTCCAGACCGACAGGGTGGTGAAGCTGTTCCA 120
3  E P K A I D P K L S T T D R V V K A V P 22
121  TTTCCTCCAAGTCACCGGCTTACAGCAAAAAGAAGTGTGATAATGATGGAAAACCTCGT 180
23  F P P S H R L T A K E V F D N D G K P R 42
181  GTGGATATCTTAAAGGCGCATCTTATGAAGGAGGGAAGGCTGCAAGACACTGTTGCATTG 240
43  V D I L K A H L M K E G R L E E S V A L 62
241  AGAATAATAACAGAGGGTGCATCAATTCTTCGACAGGAAAAAAATTTGCTGGATATTGAT 300
63  R I I T E G A S I L R Q E K N L L D I D 82
301  GCGCCAGTCACTGTTTGTGGGACATTCATGGACAATTCTTTGATTGATGAAGCTCTTT 360
83  A P V T V C G D I H G Q F F D L M K L F 102
361  GAAGTCGGGGGATCTCCTGCCAACACTCGGTACCTCTTCTTAGGGGACTATGTTGACAGA 420
103  E V G G S P A N T R Y L F L G D Y V D R 122
421  GGGTACTTCAGTATTGAATGTGTGCTGTATTTGTGGGCTTGAAAATTCCTACCCCAAA 480
123  G Y F S I E C V L Y L W A L K I L Y P R 142
481  ACACTGTTTTTACTTCGTGGAATCATGAATGTAGACATCTAACAGAGTATTTACATTI 540
143  T L F L L R G N H E C R H L T E Y F T F 162
541  AAACAAGAATGTAAAATAAAGTATTCAGAACGCGTATATGATGCCTGTATGGATGCCTTI 600
163  K Q E C K I K Y S E R V Y D A C M D A F 182
601  GACTGCCTTCCCTGGCTGCCCTGATGAACCAACAGTTCTCTGTGTGTCATGGTGGTTTG 660
183  D C L P L A A L M N Q Q F L C V H G G L 202
661  TCTCCAGAGATTAACACTTTAGATGATATCAGAAAATTAGACCGATTCAAAGAACCACCT 720
203  S P E I N T L D D I R K L D R F K E P P 222
721  GCATATGGACCTATGTGTGATATCCTGTGGTCAGACCCCTGGAAGATTTTGGAAATGAG 780
223  A Y G P M C D I L W S D P L E D F G N E 242
781  AAGACTCAGGAACATTTCACTCACAACACAGTCAGGGGCTGTTCTACTTCTACAGTTAC 840
243  K T Q E H F T H N T V R G C S Y F Y S Y 262

```



【図3】

```

841 CCGGCTGTATGTGAATCTTACAGCACAATAACTTGTATCTATACTCCGAGCCCACGAA 900
263 P A V C E F L Q H N N L L S I L R A H E 282
901 GCCCAAGATGCAGGGTACCGCATGTACAGGAAAAGCCAAACAACAGGCTTCCCTTCTCTA 960
283 A Q D A G Y R M Y R K S Q T T G F P S L 302
961 ATTACAATTTTTTCAGCACCAAATTACTTAGATGTATACAATAACAAAGCTGCAGTATTG 1020
303 I T I F S A P N Y L D Y Y N N K A A V L 322
1021 AAGTATGAGAACAATGTATGAATATCAGGCAATTCAACTGTTCTCTCATCCATACTGG 1080
323 K Y E N N V M N I R Q F N C S P H P Y W 342
1081 CTTCCAAATTTTCATGGATGTTTTTACTTGGTCCCTTCCATTTGTTGGCGAAAAAGTGACT 1140
343 L P N F M D V F T W S L P F V G E K V T 362
1141 GAGATGCTGGTAAATGTCTCAACATCTGCTCAGATGATGAACTAGGGTCAGAAGAAGAT 1200
363 E M L V N V L N I C S D D E L G S E E D 382
1201 GGATTTGATGGTGCAACAGCTGCAGCCCGGAAAGAGGTGATAAGGAACAAGATCCGAGCA 1260
383 G F D G A T A A A R K E V I R N K I R A 402
1261 ATAGGCAAAATGCCAGAGTGTCTCAGTGCTCAGAGAAGAGAGTGAGAGTGTCTCTGAGC 1320
403 I G K M A R V F S Y L R E E S E S Y L T 422
1321 CTGAAAGGCTTGACCCCACTGGCATGCTCCCCAGCGGAGTACTTTCTGGAGGGAAGCAA 1380
423 L K G L T P T G M L P S G V L S G G K Q 442
1381 ACCCTGCAAAAGCGCTATCAAAAGGATTTTACCACAACATAAGATCACTAGCTTCGAGGAA 1440
443 T L Q S A I K G F S P Q H K I T S F E E 462
1441 GCCAAGGGCTTAGACCGAATTAATGAGAGGATGCCGCCTCGCAGAGATGCCATGCCCTCT 1500
463 A K G L D R I N E R M P P R R D A M P S 482
1501 GACGCCAACCTTAACCTCATCAACAAGGGTCTCACCTCAGAGACTAACGCCACGGACAGC 1560
483 D A N L N S I N K G L T S E T N G T D S 502
1561 AATGGCAGTAATAGCAGCAATATTCAGTGACCACTTCCTGTTCACTTTTTTTTTTTTTT 1620
503 N G S N S S N I Q 512

```



[図4]

CNAA					-9	-1
CNBA1					MAAPEPARA	
CNBA2					MAAPEPARA	
	1	10	20	30	40	50
CNAA	MSEPKAIDPKLSTTDRVYKAVPPPSHRLTAKEVFDNDGKPRVDILKAHLMKEGRLEESV					
CNBA1	APPPPPPPPPPGADRYKAVPPPTHRLTSEEVDLDGIPRYDVLKNHLYKEGRVDEEI					
CNBA2	APPPPPPPPPPGADRYKAVPPPTHRLTSEEVDLDGIPRYDVLKNHLYKEGRVDEEI					
	70	80	90	100	110	120
CNAA	ALRIITEGASILRQERNLLDIDAPYTVCGDIHGQFFDLMKLFEVGGSPANTRYLFLGDYV					
CNBA1	ALRIINEGAAILRREKTNIEVEAPITVCGDIHGQFFDLMKLFEVGGSPANTRYLFLGDYV					
CNBA2	ALRIINEGAAILRREKTNIEVEAPITVCGDIHGQFFDLMKLFEVGGSPANTRYLFLGDYV					
	130	140	150	160	170	180
CNAA	DRGYFSIECVLYLWALKILYPATLFLLRGNHECRHLTEYFTFKQECKIKYSERYVDACMD					
	PIVIGTEDISINPHNNINE					
CNBA1	DRGYFSIECVLYLWVLKILYPSTLFLLRGNHECRHLTEYFTFKQECKIKYSERYEACME					
CNBA2	DRGYFSIECVLYLWVLKILYPSTLFLLRGNHECRHLTEYFTFKQECKIKYSERYEACME					
	190	200	210	220	230	240
CNAA	AFDCLPLAALMNQQFLCVHGGLSPEINTLDDIRKLDREKPPAYGPMCDILWSDPLEDFG					
CNBA1	AFDSLPLAALLNQQFLCVHGGLSPEIHTLDDIRRLDRFKPPAFGPMCDLLWSDPSEDFG					
CNBA2	AFDSLPLAALLNQQFLCVHGGLSPEIHTLDDIRRLDRFKPPAFGPMCDLLWSDPSEDFG					
	250	260	270	280	290	300
CNAA	NEXTQEHFTHNTVRGCSYFYSTPAYCEFLQHNNLLSILRAHEAQDAGYRMYRKSQTTGFP					
CNBA1	NEKSQEHFTHNTVRGCSYFYNTPAYCEFLQNNLLSILRAHEAQDAGYRMYRKSQTTGFP					
CNBA2	NEKSQEHFTHNTVRGCSYFYNTPAYCEFLQNNLLSILRAHEAQDAGYRMYRKSQTTGFP					
	310	320	330	340	350	360
CNAA	SLITIFSAPNYLDVYNNKAAVLKYENNVNIRQFNCSHPYTWLPNFMVDVFTWSLPFYGEX					
CNBA1	SLITIFSAPNYLDVYNNKAAVLKYENNVNIRQFNCSHPYTWLPNFMVDVFTWSLPFYGEX					
CNBA2	SLITIFSAPNYLDVYNNKAAVLKYENNVNIRQFNCSHPYTWLPNFMVDVFTWSLPFYGEX					



(14)

特開平6-181778

フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁵
//(C 1 2 N 1/21
C 1 2 R 1:19)
(C 1 2 N 9/16
C 1 2 R 1:19)

識別記号 庁内整理番号 F I

技術表示箇所

